

**RODRIGO MAKOWIECKY STUART**

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA SOJA  
(*Glycine max* (L.) Merrill) NOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO ORGÂNICO E  
CONVENCIONAL**

**Monografia apresentada para a obtenção do  
Título de Bacharel em Ciências Biológicas, no  
Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel**

**CURITIBA**

**2004**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família, pelo carinho, compreensão, educação e ética que me foram dados, pois sem estes seria impossível a elaboração deste trabalho.

À Ana Paula Azambuja cujo amor, carinho, compreensão e diversas idéias criativas foram indispensáveis para a continuidade deste trabalho.

À orientadora e amiga Professora Ida Chapaval Pimentel pela confiança, apoio e orientação.

Ao Professor José Marcelo Rocha Aranha, do Departamento de Zoologia, pela ajuda na elaboração e análise dos cálculos de ecologia.

Ao Professor Juarez Gabardo, do Departamento de Genética, pela ajuda na elaboração e análise dos cálculos estatísticos.

À Professora Yanê de Carvalho, do Departamento de Patologia Básica, pela ajuda durante a parte laboratorial do trabalho.

A todos da Fazenda Capão da Palmeira que permitiram a realização do estudo.

À Tozan Alimentos Orgânicos S/A pelo fornecimento das sementes e esclarecimento de dúvidas.

Aos amigos que muitas vezes, entre uma cerveja e outra, promoveram as mais divertidas e intrigantes discussões.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“A luta contra o erro tipográfico tem algo de homérico. Durante a revisão os erros se escondem, fazem-se positivamente invisíveis. Mas assim que o livro sai, tornam-se visibilíssimos, verdadeiros Sacis a nos botar a língua em todas as páginas. Trata-se de um mistério que a ciência ainda não conseguiu decifrar...”

Monteiro Lobato

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	01
1.2 DIVERSIDADE ECOLÓGICA.....	04
1.2.1 Importância do Estudo da Diversidade Microbiana.....	05
1.3 SOJA ( <i>Glycine max</i> (L.) Merrill).....	06
1.4 SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE SOJA.....	07
1.4.1 Sistema de Produção Convencional.....	07
1.4.2 Sistema de Produção Orgânico.....	08
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>09</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
4.1 MEIO DE CULTURA.....	10
4.1.1 Meio Batata – Dextrose – Ágar (BDA).....	10
4.1.2 Meio Infuso de Folha de Soja (MIFS).....	11
4.2 SOLUÇÕES.....	11
4.2.1 Solução de Tween 0,1%.....	11
4.3 CORANTE E CLAREADOR.....	11
4.3.1 Lactofenol Azul de Algodão (CRUZ, 1981).....	11
4.3.2 Lactofenol de Amann (CRUZ, 1981).....	12
4.4 MATERIAL BIOLÓGICO.....	12
4.5 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	14
4.6 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	16
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	16
4.7.1 Técnica do microcultivo (KERN & BLENVIS, 1999).....	16
4.8 ÍNDICES ECOLÓGICOS.....	17

4.8.1	Diversidade de Shannon.....	17
4.8.2	Riqueza de Margalef.....	18
4.8.3	Equitabilidade de Sheldon.....	18
4.8.4	Cálculo de Similaridade entre as Comunidades.....	18
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
5.1	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	19
5.2	IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE ECOLÓGICA.....	21
5.3	FUNGOS ENDOFÍTICOS ENTOMOPATOGÊNICOS DA SOJA ORGÂNICA E DA SOJA CONVENCIONAL.....	30
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>32</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>
<b>ANEXO</b>	<b>.....</b>	<b>39</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01	– MAPA DO ESTADO DO PARANÁ.....	13
FIGURA 02	– ESQUEMA DE COLETA DA SOJA REALIZADA NA FAZENDA CAPÃO DA PALMEIRA.....	13
FIGURA 03	– ESQUEMA DE DESINFECÇÃO FOLIAR PARA A ELIMINAÇÃO DE FUNGOS EPIFÍTICOS.....	15
FIGURA 04	– ESQUEMA DA TÉCNICA DE FRAGMENTAÇÃO DA FOLHA PARA A OBTENÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	15
GRÁFICO 01	– NÚMERO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE ORGÂNICA E CONVENCIONAL AOS 40 E 60 DIAS APÓS GERMINAÇÃO DAS SEMENTES.....	20
GRÁFICO 02	– DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DO ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE HORN, COMPARANDO OS GRUPOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL AOS 40 E 60 DIAS.....	25

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO TOTAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS EM RELAÇÃO AO TIPO DE CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL (NATUREZA) E ÉPOCA (40 E 60 DIAS APÓS GERMINAÇÃO DAS SEMENTES).....	21
TABELA 02 – FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL AOS 40 E 60 DIAS APÓS A GERMINAÇÃO DAS SEMENTES.....	21
TABELA 03 – DIVERSIDADE, RIQUEZA E EQUITABILIDADE DAS COMUNIDADES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL AOS 40 E 60 DIAS.....	25
TABELA 04 – DIVERSIDADE, RIQUEZA E EQUITABILIDADE DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL.....	28
TABELA 05 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS POSSIVELMENTE ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL.....	31

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade de fungos endofíticos de folhas de soja provenientes de cultivo orgânico e convencional aos 40 e 60 dias após germinação das sementes. Foram isolados 1822 fungos endofíticos da soja orgânica e 1783 de soja convencional aos 40 dias, e 659 fungos endofíticos de soja orgânica e 505 de soja convencional aos 60 dias. A diversidade apresentada pelo sistema orgânico foi superior ao demonstrado pelo sistema convencional, sendo observado, pelo índice de similaridade de Horn, a presença de duas comunidades distintas de fungos endofíticos, uma caracterizada pelos isolados da soja orgânica e outra pelos isolados da soja convencional. A comunidade de fungos da soja orgânica apresentou riqueza e equitabilidade maiores que a soja convencional, indicando que esta apresenta um número menor de espécies e uma maior dominância de algumas espécies sobre as outras em relação aquela. A análise dos endófitos possivelmente entomopatogênicos demonstrou que 14,71% dos fungos isolados de soja orgânica são possíveis entomopatogênicos, sendo estes *Acremonium* spp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* spp. e *Paecilomyces* sp., enquanto que, para a soja convencional observou-se apenas *Acremonium* spp., *Fusarium* spp. e *Verticillium* sp., correspondente a 7,47% dos isolados. Deste modo, a soja orgânica estaria mais protegida, contra o ataque de pragas, que a soja convencional, uma vez que os fungos endofíticos estão normalmente associados a defesa natural da planta contra pragas e doenças. Não só a presença destes faria a soja orgânica mais protegida, mais também, a maior diversidade dos fungos isolados da mesma, o que confere a comunidade de fungos maior resistência a distúrbios externos, tais como condições climáticas, nutricionais e a própria competição intra e inter específicas, e a capacidade de retornarem mais facilmente ao equilíbrio.

Palavras-chave: Fungos Endofíticos; Soja Orgânica; Soja Convencional; Diversidade; Fungos Entomopatogênicos



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Todos os microrganismos que habitam o interior de um vegetal, ao menos um período de seu ciclo de vida, podem ser considerados endofíticos (AZEVEDO et al., 2000). Tais microrganismos ocupam os espaços intercelulares dos tecidos vegetais (STROBEL, 2003), sendo encontrados, de modo geral, nas partes aéreas das plantas, como folhas e caules, sem causar danos aparentes (AZEVEDO, 1998). Esta definição pode ser aplicada não somente aos simbioses, mutualistas ou neutros, mas também aos microrganismos patogênicos latentes e inativos (PETRINI, 1991).

Os microrganismos endofíticos foram inicialmente descritos por Barry em 1866 (AZEVEDO, 1998), entretanto somente receberam a devida atenção nos últimos 20 anos, onde pesquisas demonstraram que estes, até então considerados neutros, ou seja, não causavam benefícios ou malefícios às plantas, desempenhavam um papel importante na proteção contra o ataque de doenças, insetos e animais herbívoros. Mais recentemente descobriu-se que os endófitos estariam também envolvidos no desenvolvimento das plantas, aumentando sua taxa de crescimento, enraizamento e resistência a estresses bióticos e abióticos (HALLMANN et al., 1997), demonstrando uma íntima relação evolutiva entre plantas e microrganismos endofíticos. Segundo STROBEL (2003) esta relação provavelmente iniciou-se, a aproximadamente 100 milhões de anos, com o surgimento das primeiras plantas na terra.

Os organismos endofíticos destacam-se por sua importância potencial no controle natural de doenças e pragas vegetais. Fungos entomopatogênicos bastante conhecidos e utilizados no controle biológico de insetos pragas na agricultura são encontrados como endófitos. Este é o caso de *Beauveria bassiana*, endófito do milho protegendo o hospedeiro contra o ataque de insetos (BING e LEWIS, 1993; WAGNER e LEWIS, 2000; PIMENTEL, 2001).

A relação dos fungos endofíticos com os insetos-pragas vem sendo discutida desde a década de 80, quando começaram a surgir, na literatura especializada, casos

evidenciando o importante papel desempenhado pelos microrganismos endofíticos, no caso fungos, sobre suas plantas hospedeiras.

WEBBER (1981) provavelmente reportou o primeiro exemplo de proteção fornecido por um fungo endofítico. O endófito *Phomopsis oblonga* foi descrito protegendo as olmeiras contra o besouro *Physocnemus brevilineum*.

FUNK et al. (1983) observaram fungos protegendo a gramínea azevém ou raigrás, de clima temperado, (*Lolium perene*) contra lagartas do gramado.

BREEN (1993a, 1993b) e CARROL (1995) descreveram o fungo endofítico *Rhabdocline parkeri*, freqüente em abeto ou Pinheiro de Douglas, como controlador de galhas causadas por larvas de insetos do gênero *Contarinia* sp.. Neste caso foi observado que o controle ocorreu através da produção de substâncias metabólicas que possuíam potencial inibitório para o desenvolvimento do inseto-praga.

Durante a evolução das plantas ocorreram associações mutualísticas com fungos endofíticos que promoveram adaptações relacionadas a capacidade de defesa da planta contra insetos, microrganismos e animais herbívoros através da produção de uma variedade de compostos secundários como alcalóides, terpenóides, esteróides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos a seus inimigos (LIU et al., 2001).

*Artemisia annua*, planta da família Composite, é bem conhecida por produzir um composto antifúngico denominado artemisina, que protege a planta contra fungos fitopatogênicos. LIU et al. (2001) observaram que 21 fungos endofíticos isolados de *Artemisia annua* possuíam atividade antagônica ao crescimento dos fungos fitopatogênicos *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum*, *Fusarium graminearum*, *Gerlachia nivalis* e *Phytophthora capsici*, sugerindo que a defesa da planta seria, na verdade, decorrente da presença de fungos endofíticos.

*Muscodor albus* um novo fungo endofítico isolado da planta de canela (*Cinnamomum zeilanicum*) demonstrou ser capaz de inibir e matar outros fungos e bactérias pela produção de cinco tipos diferentes de compostos metabólitos voláteis (STROBEL et al., 2001).

Os fungos endofíticos destacam-se também por seu potencial biotecnológico, sendo úteis ao homem pela produção de determinadas drogas utilizadas na medicina. Este é o exemplo do taxol, uma droga anticancerígena produzida pelos fungos endofíticos *Taxomyces andreanae*, *Pestalotiopsis microspora*, *Periconia* sp., *Tubercularia* sp. e *Trichothecium* sp., e altamente utilizada na indústria farmacêutica (STROBEL, 2003).

A importância dos fungos endofíticos para a manutenção dos sistemas agrícolas centrado no equilíbrio ecológico remete a diminuição da utilização de agrotóxicos pela presença da defesa natural conferida pelos endófitos da planta.

Por muitos anos o controle das fitomoléstias tem sido realizado pelo uso indiscriminado de substâncias químicas como inseticidas e fungicidas, que atuam de forma devastadora sobre o meio ambiente deixando resíduos no ecossistema e na produção agrícola. O uso indiscriminado destes agroquímicos, com o passar do tempo, causa a resistência destas fitomoléstias, sendo necessário o uso de produtos cada vez mais fortes e prejudiciais ao meio ambiente e a saúde.

A importância de se conhecer as populações de fungos endofíticos bem como as interações com suas plantas hospedeiras e o meio ambiente é o passo inicial para a adoção de técnicas agrícolas mais seguras, econômicas e rentáveis. Isto refere-se principalmente a manutenção do equilíbrio dos agroecossistemas. Segundo CHABOUSSOU (1987) existem provas científicas de que doenças, ataques de insetos e até mesmo viroses podem ser causadas não só pela presença de organismos, como bactérias, fungos, vírus e insetos, mas também pelo desequilíbrio biológico causado pelo manejo incorreto do solo e do meio ambiente onde a planta está inserida, o que a torna mais suscetível. À partir destas informações, compreende-se que a suscetibilidade da planta a pragas e doenças também é uma questão de nutrição ou intoxicação. A planta equilibrada, em crescimento vigoroso ou em descanso não se torna atrativa as pragas. Estas necessitam encontrar na planta hospedeira alimentos como aminoácidos, açúcares e sais minerais solúveis, ainda não incorporados em macromoléculas insolúveis. Tal situação ocorre quando há inibição da proteossíntese

ou quando há excesso de produção de aminoácidos – o que ocorre pelo uso abusivo de adubos nitrogenados e agroquímicos.

Também segundo CHABOUSSOU (1987) o uso de agrotóxicos no combate de doenças ou pragas, pode promover posteriormente, o surgimento de outras doenças ou mesmo pragas. Os agroquímicos podem provocar modificações no metabolismo das plantas, enriquecendo os líquidos celulares e circulantes, que em excesso não são incorporados a proteossíntese.

Pode-se supor também, que o uso destas substâncias agroquímicas podem possuir certo efeito sobre a biota de microrganismos endofíticos das plantas, alterando a diversidade dos mesmos, influenciando as relações entre plantas e endófitos e diminuindo as defesas naturais das mesmas.

## 1.2 DIVERSIDADE ECOLÓGICA

Segundo MAGURRAN (1988) a diversidade ecológica é formada de dois componentes: a variedade e a abundância relativa de espécies. Sendo seu cálculo baseado na riqueza (número de espécies) e na equitabilidade (a semelhança na abundância das espécies de uma determinada amostra).

A diversidade tem um papel importante na manutenção da estrutura dos ecossistemas. Ecossistemas com alta diversidade tendem a ser capazes de se recuperar de perturbações e restaurar o equilíbrio em seus processos de ciclagem de materiais e fluxo de energia. Em ecossistemas com baixa diversidade, as perturbações podem provocar, mais facilmente, modificações permanentes no funcionamento, resultando na perda de recursos do ecossistema e em alterações na constituição das espécies (GLIESSMAN, 2000). Para PERFECT (1994) a alta diversidade de um sistema cria uma capacidade amortecedora que faz com que as perturbações possuam pouco efeito na funcionalidade do mesmo.

A diversidade tem sido dividida em dois tipos: a taxonômica e a funcional. A primeira tem como preocupação a enumeração da totalidade de espécies encontradas em um sistema, enquanto a segunda preocupa-se em identificar a importância das

mesmas para o manejo correto de uma área ou região, afim de minimizar a perda de biodiversidade (WALKER, 1991).

Índices de diversidade de comunidades baseiam-se no conceito de que a estrutura de uma comunidade pode ser alterada por perturbações no ambiente, e o grau de alteração pode ser utilizado para acessar a intensidade do estresse ambiental como resultado de uma intervenção (HELLAWELL, 1986).

### 1.2.1 Importância do Estudo da Diversidade Microbiana

Os microrganismos são os mais antigos e numerosos seres da terra, os quais, através de sua diversidade metabólica e adaptabilidade genética, colonizaram com sucesso todos os nichos ecológicos conhecidos, incluindo ambientes extremamente inóspitos para a maioria dos seres vivos (O'DONNELL et al., 1995). Sua presença e atividade são essenciais para a saúde e funcionamento dos ecossistemas e do ambiente, através de processos como mineralização e reciclagem de importantes elementos, contribuindo para a fertilidade do solo, controle de pragas e vetores, fotossíntese e eliminação de poluentes ambientais (OLEMBO, 1994).

O estudo da diversidade microbiana, seja em sistemas naturais ou agrícolas, promove o entendimento das relações entre microrganismos e o ambiente, sua funcionalidade e, não muito distante, sua importância econômica. Para O'DONNELL e colaboradores (1995), quase todos os processos biológicos que, direta ou indiretamente, envolvem os microrganismos são subestimados, sendo desprezados os benefícios potenciais da regulação, otimização e exploração da atividade microbiana.

As relações entre plantas e microrganismos podem ser de natureza negativa, como no caso de fungos e bactérias patogênicas, ou positiva, como as simbioses que fornecem nutrientes para as plantas, os organismos que reduzem a ocorrência de doenças, produzem substâncias estimulantes de crescimento ou melhoram a estrutura do solo e sua capacidade de absorver água (LEIJ et al., 1995).

Os sistemas agrícolas são geralmente simples quando comparados a ambientes naturais. O sistema agrícola apresenta poucas espécies de plantas, poucos

consumidores primários e, em geral, poucas espécies de controle biológico, sendo que para algumas pragas, a diversidade de inimigos naturais é maior nos sistemas naturais que nos cultivados (Waage, 1994). Ainda segundo este autor, a baixa diversidade encontrada nos sistemas agrícolas pode ser atribuída aos efeitos das técnicas de plantio sobre a sobrevivência dos organismos, incluindo-se o uso indiscriminado de pesticidas. A ação dos pesticidas sobre a diversidade de organismos controladores naturais é apenas temporária, entretanto, longos estudos sobre o uso de pesticidas tem revelado que a aplicação persistente dos mesmos pode eliminar do ambiente agrícola espécies que possuam uma baixa mobilidade adaptativa (BURN, 1994).

### 1.3 SOJA (*Glycine max* (L.) Merril)

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é uma planta, nativa da Ásia, da família Leguminosae, subfamília Papilionoideae.

A soja foi inicialmente plantada por fazendeiros da metade norte oriental da China, durante a dinastia Shang (1700 – 1100 A.C.), onde serviu como alimento para animais e como remédio para tratamento de algumas doenças humanas (SINCLAIR e BACKMAN, 1993). Atualmente é cultivada em várias partes do mundo, sendo uma importante fonte de proteínas e óleo vegetal.

O Brasil é o segundo produtor mundial de soja (AGRIANUAL, 2001), com produtividade média, nos últimos três anos, de 2.398 kg ha<sup>-1</sup>. Apesar da soja ser considerada cultura de grandes produtores, o tamanho médio das áreas cultivadas no País é de 38,02 hectares (IBGE, 1998).

A cultura da soja, que ocupa o segundo lugar no país, considerando-se a área cultivada e a produtividade, é de extrema importância econômica para o Estado do Paraná, um de seus maiores produtores, e consequentemente para o Brasil, não somente em termos de divisas (exportação), mas também para alimentação humana e animal (ROBBS e BITTENCOURT, 1998).

Segundo a Federação da Agricultura do Estado do Paraná (FAEP, 2003) o Paraná encontra-se como o segundo maior produtor nacional de soja, com área

plantada superior a 3 milhões de hectares e produção de 9,4 milhões de toneladas na safra 2002/03. As exportações do complexo soja, grãos, farelo e óleo foram responsáveis pela receita de US\$ 3.733 milhões, sendo os principais mercados importadores Estados Unidos, Europa e Japão.

## 1.4 SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE SOJA

### 1.4.1 Sistemas de Produção Convencional

O sistema de produção conduzido pela maior parte dos produtores agrícolas é conhecido como convencional (PC) ou tradicional, onde são utilizadas tecnologias disponíveis acrescentadas, ou não, de outras derivadas de experiências individuais geradas na região ou mesmo fora dela. Neste caso, cada produtor define como tais componentes irão se associar, sendo esta decisão dependente do treinamento, recursos financeiros e das condições “agroecológicas” da propriedade (VALDEBENITO SANHUEZA, 2000).

O sistema convencional caracteriza-se principalmente pela utilização de substâncias agroquímicas para a manutenção dos cultivares, sendo tais substâncias, geralmente nocivas a saúde e ao meio ambiente. Os fungicidas geralmente exercem efeito inibitório sobre a biomassa microbiana (ANDERSON et al., 1981) enquanto os herbicidas tendem a exercer efeitos variáveis, geralmente com menor impacto ou intensidade, quando comparados com a variação espacial e temporal de biomassa microbiana (WARDLE e PARKINSON, 1991).

Os impactos gerados pelo uso de agroquímicos causam efeitos locais sobre a microbiota das plantas. Não somente as populações podem ser afetadas pelos tratamentos culturais, mas também as interações entre os diversos microrganismos, como as ações antagonísticas, as infecções e a patogênese.

Deve-se salientar que a exposição a altas concentrações de substâncias agroquímicas pode promover alterações de natureza genética, fisiológica e comportamental nas espécies envolvidas, promovendo uma maior tolerância ou

resistência ao produto, um enfraquecimento da atividade reprodutória, uma redução da atividade enzimática e redução ou inibição do crescimento (SCHNURER e ROSSWAL, 1987).

A aplicação dos agroquímicos por pulverização pode resultar na exposição significativa dos organismos não alvo, incluindo organismos selvagens, habitantes de áreas vizinhas aos campos tratados. Vários estudos demonstram que somente cerca de 50 % dos pesticidas aplicados por via aérea atingem a área alvo (GRUE et al., 1986; DAVIS e WILLIAMS, 1990).

#### 1.4.2 Sistema de Produção Orgânico

O sistema de produção orgânico é definido como sendo um sistema sustentável em tempo e espaço, característico pela manutenção e proteção dos recursos naturais pela ausência do uso de substâncias químicas que, muitas vezes, são agressivas aos humanos e ao ambiente (BETTIOL et al., 2002).

Tanto quanto possível, os sistemas agrícolas orgânicos dependem das rotações de culturas, restos de culturas, esterco animal, leguminosas, adubos verdes e resíduos orgânicos de fora das fazendas, bem como de cultivo mecânico, uso de minerais e controle biológico de pragas, para manter a produtividade e a estrutura do solo, fornecer nutrientes para as plantas e controlar insetos, ervas invasoras e outros organismos daninhos (SIVAPALAN et al., 1993).

A agricultura orgânica vem se tornando uma tendência mundial, sendo valorizada principalmente como produto de exportação. Segundo a Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas, o mercado mundial de produtos orgânicos superou os 10 bilhões de dólares (SCIALABBA e HATTAM, 2002). A mesma fonte registra que mais de 100 países produzem “commodities” orgânicas certificadas, com expressiva participação dos países desenvolvidos.



## 2. JUSTIFICATIVA

A produção nacional de soja corresponde a grande parte das exportações brasileiras. A monocultura implantada como alternativa de alta produtividade agrícola desfavorece o equilíbrio ecológico, favorecendo a explosão populacional de pragas durante todo o ciclo de cultivo. O controle destas, é feito em sua maioria, pelo uso intenso de defensivos químicos, que geram grandes danos ao meio ambiente.

Por outro lado, a agricultura orgânica, característica por não utilizar defensivos agrícolas, tem se tornado uma alternativa segura e rentável para o homem e o ambiente. Porém parte da produção orgânica pode ser comprometida por pragas, sendo necessário, para o controle das mesmas, o uso de técnicas alternativas ao uso de agroquímicos. Uma boa alternativa tem sido a utilização do controle biológico como forma de defesa.

Deste modo, a identificação da microbiota de fungos endofíticos é de extrema importância para o entendimento das relações planta-endofítico-ambiente. Primeiro, porque a fisiologia dos fungos endofíticos é pouco conhecida e faltam informações para elucidar a base biológica das relações ecológicas. Segundo, porque os endófitos são potencialmente vantajosos em diversos aspectos. Mesmo fungos entomopatogênicos bem conhecidos e utilizados no controle biológico são encontrados como endófitos.

A importância do estabelecimento deste trabalho reside no fato de que as pesquisas são poucas e a grande maioria é realizada em condições de clima temperado, nos quais o problema das pragas agrícolas não é tão premente como em culturas de climas tropicais. Sendo assim, é cada vez mais importante o estudo de microrganismos endofíticos, principalmente devido ao desequilíbrio biológico que vem sendo causado pelo uso abusivo e indiscriminado de agroquímicos, que contribuem modificando radicalmente a microbiota endofítica, podendo inclusive explicar a emergência, em vegetais superiores, de doenças e pragas até então desconhecidas ou sem importância econômica.

Dentro deste contexto a identificação de fungos endofíticos contribuirá para o conhecimento da possível influência do uso de defensivos químicos sobre a microbiota dos mesmos, através da comparação de suas diversidades em soja orgânica e convencional.

### 3. OBJETIVOS

- Identificar e caracterizar biologicamente os fungos endofíticos de soja orgânica e convencional.
- Comparar a diversidade de fungos endofíticos existente entre os dois tipos de sistemas de produção.
- Identificar possíveis fungos endofíticos entomopatogênicos.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 MEIOS DE CULTURA

##### 4.1.1 Meio Batata – Dextrose – Ágar (BDA)

Batata.....	200,0g
Dextrose.....	20,0g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000mL

As batatas foram cortadas em pedaços pequenos e cozidas em 1000mL de água destilada por 15 minutos. O caldo resultante foi filtrado e o que foi perdido por evaporação foi completado com água destilada perfazendo 1000mL. Adicionou-se dextrose e ágar corrigindo-se o pH para 6,8 com NaOH e/ou HCl 1N conforme necessidade. O meio foi autoclavado a 1 atm por 30 minutos.

#### 4.1.2 Meio Infuso de Folha de Soja (MIFS)

Folha de Soja .....	100,0g
Dextrose.....	20,0g
Ágar.....	15,0g
Peptona.....	5,0g
Água destilada.....	1000mL

As folhas de soja foram cozidas em 400 mL de água destilada por 15 minutos. O caldo resultante foi filtrado e completado com água destilada perfazendo 1000mL. Adicionou-se dextrose, ágar e peptona corrigindo-se o pH para 6,8 com NaOH e/ou HCl 1N conforme necessidade. O meio foi autoclavado a 1 atm por 30 minutos.

#### 4.2 SOLUÇÕES

##### 4.2.1 Solução de “Tween 80” 0,1%

“Tween 80” .....	0,1mL
Água destilada.....	99,9mL

Misturou-se os componentes e autoclavou-se por 30 minutos a 1 atm.

#### 4.3 CORANTE E CLAREADOR

##### 4.3.1 Lactofenol Azul de Algodão (CRUZ, 1981)

Ácido lático.....	20,0g
Cristais de fenol.....	20,0g
Glicerina.....	20,0g
Azul de algodão (Methyl blue Difco).....	0,05g

Água destilada.....20,0mL

Os cristais de fenol foram fundidos em banho-maria, sendo os compostos adicionados em seguida. Esperou-se 24 horas e filtrou-se a solução.

#### 4.3.2 Lactofenol de Amann (CRUZ, 1981)

Ácido láctico.....10,0g

Ácido fênico.....10,0g

Glicerina.....20,0g

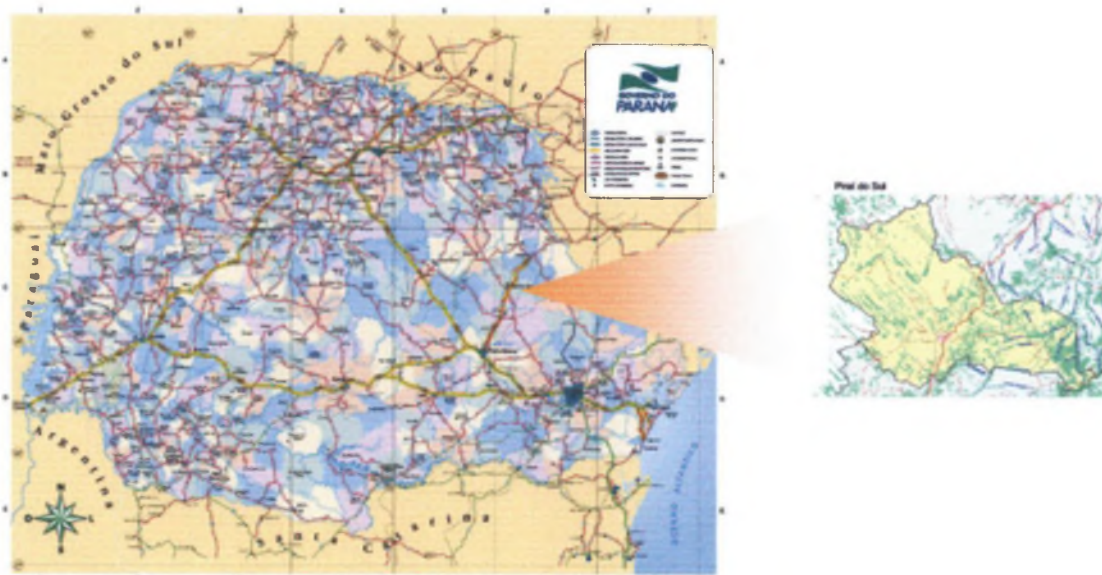
Água destilada.....10,0mL

#### 4.4 MATERIAL BIOLÓGICO

Os fungos endofíticos foram isolados de amostras compostas por folhas de soja, obtidas em campo cultivado com a variedade BR 36 (cultivo orgânico e convencional) cujas sementes foram fornecidas pela Tozan Alimentos Orgânicos S/A, na Fazenda Capão da Palmeira, município de Piraí do Sul, Paraná, Brasil (FIGURA 01).

As sementes de soja, orgânica e convencional, foram semeadas no dia 2 de novembro de 2002, sendo as coletas realizadas, tanto para uma quanto para a outra, aos 40 e 60 dias após a germinação das sementes, nos dias 08 de dezembro de 2002 e 03 de janeiro de 2003 respectivamente. As coletadas foram feitas de forma aleatória em uma área previamente demarcada de 3 ha, em duas glebas paralelas (orgânico e convencional) com divisas de barreiras, adotando-se o caminharmento em zigue-zague, em 10 pontos distintos (10 plantas por ponto), sendo as amostras processadas após a coleta (FIGURA 02).

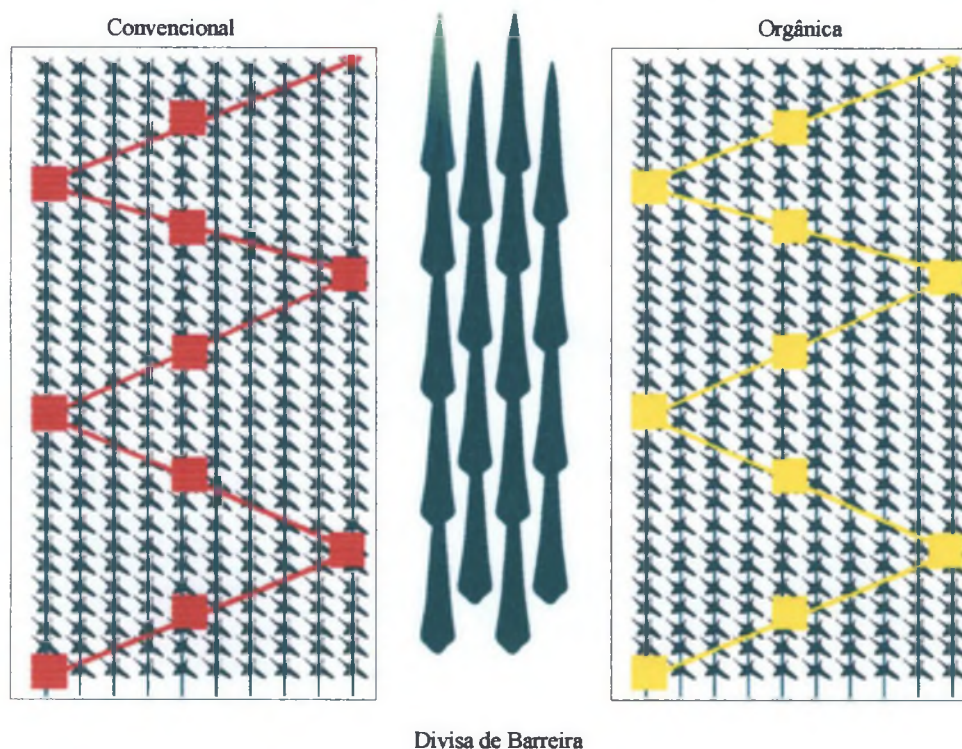
FIGURA 01 – MAPA DO ESTADO DO PARANÁ.



FONTE: Governo do Estado do Paraná

NOTA: Em detalhe o Município de Pirai do Sul.

FIGURA 02 – ESQUEMA DE COLETA DA SOJA REALIZADA NA FAZENDA CAPÃO DA PALMEIRA



NOTA: Em vermelho e amarelo estão representados os dez pontos de coleta de soja no cultivo convencional e orgânico respectivamente.

Durante o desenvolvimento das plantas, estas receberam tratamentos diferenciados quanto ao tipo de cultivo, orgânico e convencional (ANEXO). As plantas de soja orgânica receberam: o biofertilizante “super-magro” e o agente de controle biológico baculovírus aos 50 dias (20/12/2002) e aos 70 dias (11/01/2003); e novamente baculovírus aos 108 dias após germinação das sementes (26/02/2003). As plantas de soja convencional receberam “super-magro”, baculovírus e herbicida “Pacto” aos 50 dias (20/12/2002); “super-magro”, baculovírus, herbicida “Podium” e inseticida “Certero” aos 70 dias (11/01/2003); e fungicida “Cercobim” aos 126 dias após germinação das sementes (10/03/2003).

#### 4.5 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

As plantas de soja foram armazenadas em caixas de isopor que continham, em seu interior, folhas de papel toalha umedecidos, afim de evitar o ressecamento excessivo durante o transporte até Curitiba. Todo o material foi lavado em água corrente, tomando-se o cuidado de não ferir as amostras. As folhas saudáveis, sem sintomas de doença ou ataque de pragas, foram destacadas e suas extremidades vedadas com parafina derretida, afim de impedir a entrada de hipoclorito e etanol no interior das amostras.

A técnica utilizada para a obtenção de fungos endofíticos de folhas, foi a desinfecção de superfície foliar, que consiste na imersão (2x) em água destilada esterilizada, 1 minuto em etanol 70%, 4 minutos em hipoclorito de sódio 3%, 30 segundos em etanol 70% e finalmente lavados (3x) em água destilada esterilizada por 1 minuto (FIGURA 03). Foram feitas, de cada repetição, placas controle contendo 0,1 mL da última água destilada utilizada na lavagem, para verificação de possíveis fungos epifíticos contaminantes (PETRINI, 1986). A seguir as folhas foram cortadas assepticamente em 6 pequenos fragmentos (5-7 mm) e transferidos para placas de Petri (90 mm) contendo meio de cultura BDA com tetraciclina (100µg/L de meio) (FIGURA 04). Foram preparadas 200 placas de Petri por tratamento (orgânica 1ª e 2ª coletas e convencional 1ª e 2ª coletas), totalizando 800 placas, cada uma com 6

fragmentos foliares num total de 2400 fragmentos. As placas foram incubadas a 28°C e observas diariamente pelo período de 30 dias. Os fungos isolados foram repicados em tubos com meio de cultura BDA e incubados a 28°C sendo, após o crescimento, mantidos a 4°C.

FIGURA 03 – ESQUEMA DE DESINFECÇÃO FOLIAR PARA A ELIMINAÇÃO DE FUNGOS EPIFÍTICOS.

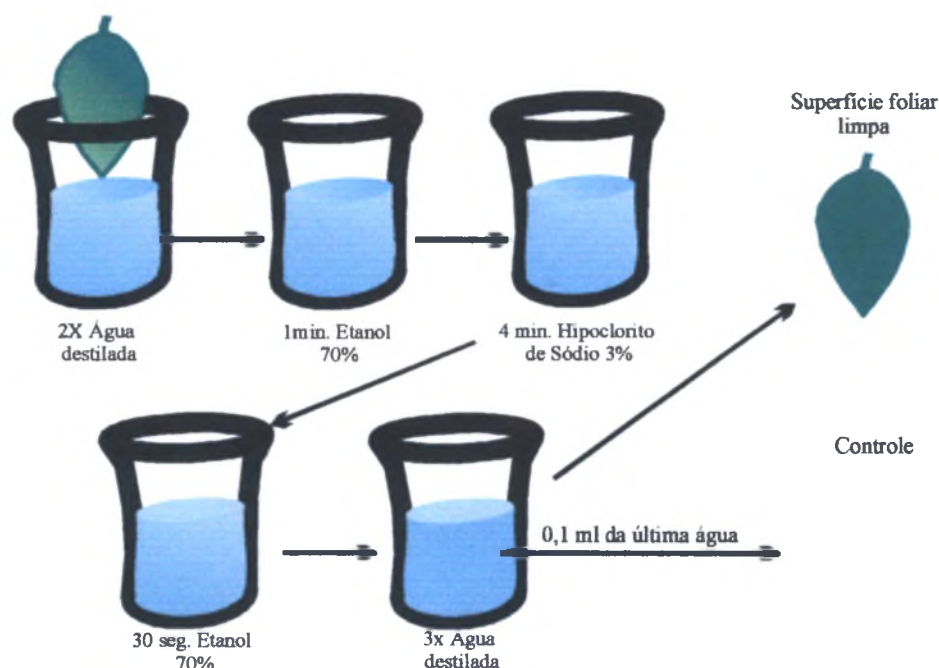
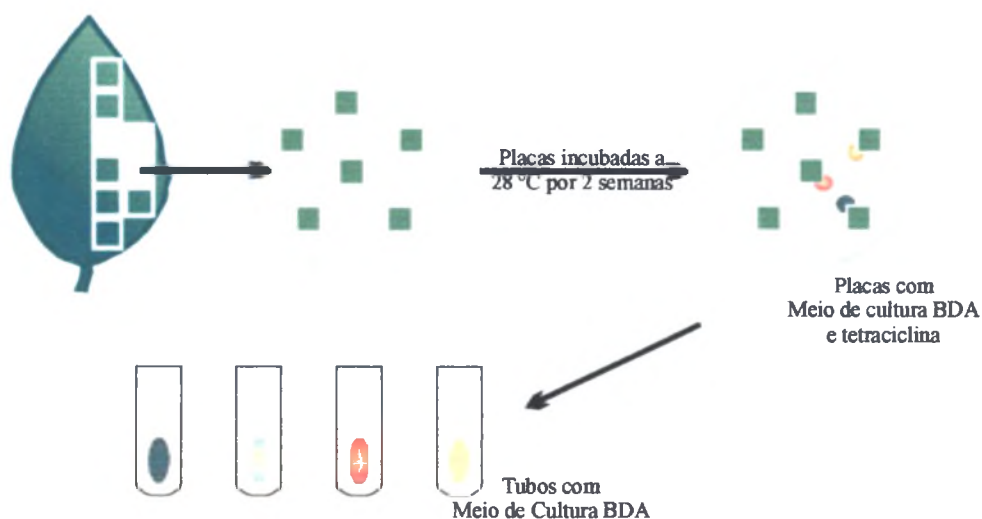


FIGURA 04 – ESQUEMA DA TÉCNICA DE FRAGMENTAÇÃO DA FOLHA PARA A OBTENÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS



#### 4.6 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados foram inicialmente purificados em solução de “Tween 80” 0,1%. Nesta técnica, um pouco do micélio do fungo foi colocado em um tubo de ensaio contendo 2,0 ml de “Tween 80” 0,1% esterilizado. Em seguida o tubo foi agitado por 3 minutos em agitador de tubos, adicionando-se, posteriormente, 100µl em uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Utilizou-se a técnica do semeadura em placa para espalhar uniformemente a solução adicionada. As placas foram incubadas à 28°C em estufa incubadora por aproximadamente 7 dias (dependente da taxa de germinação dos esporos).

#### 4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A identificação dos isolados foi realizada por meio da observação das estruturas reprodutivas (sexual e assexual) dos mesmos, utilizando o método de cultura em lâmina ou técnica do microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999) e de acordo com literatura especializada (ELLIS, 1971, 1976; BARNETT e HUNTER 1972; AINSWORTH, SPARROW e SUSSMAN, 1973; ARX, 1974; PETRINI, 1986; KONEMAN e ROBERTS, 1987; LARONE, 1987; ROSSMAN, PALM e SPIELMAN, 1987; ALVES, 1998).

##### 4.7.1 Técnica do microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999)

Para esta técnica foram utilizadas placas de Petri esterilizadas contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de 1 cm<sup>2</sup> de meio de cultura BDA foi cortado e colocado sobre a lâmina no interior da placa (utilizou-se, posteriormente, o meio MIFS para os fungos que não produziram estruturas reprodutivas com o meio BDA). Repicou-se o fungo em todos os lados do cubo, cobrindo-o posteriormente com uma lamínula esterilizada. O algodão no interior da placa foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa foi incubada em estufa



incubadora por 7 à 14 dias à 28°C. Após o tempo determinado a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de Lactofenol azul de algodão ou Lactofenol de Amann, sendo as bordas vedadas com parafina. As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico.

#### 4.8 ÍNDICES ECOLÓGICOS (MAGURRAN 1988)

##### 4.8.1 Diversidade de Shannon

A análise da diversidade ecológica foi realizada através do cálculo de diversidade de Shannon ( $H'$ ), com base na fórmula:

$$H' = -\sum (p_i \cdot \ln p_i)$$

onde,  $p_i$  representa a proporção da espécie  $i$  na amostra. O índice de Shannon assume que os indivíduos são amostrados aleatoriamente de uma população indefinidamente grande, considerando que todas as espécies são representadas na amostra. A comparação entre as diversidades dos sistemas de produção foi realizada através do cálculo da variação da diversidade e aplicação do teste  $t$ . Para isto foi calculado a variância das diversidades pela fórmula:

$$\text{Var } H' = \frac{\sum (p_i \cdot \ln p_i)^2 - (\sum p_i \cdot \ln p_i)^2}{N} - \frac{(S - 1)}{2N^2}$$

onde,  $N$  representa o número total de indivíduos e  $S$  o número total de espécies da amostra. Para o teste  $t$  utilizou-se:

$$t = \frac{(H_1' - H_2')}{(\text{Var } H_1' + \text{Var } H_2')^{1/2}}$$

Para a análise do teste *t* faz-se necessário o cálculo dos graus de liberdade (*df*) da amostra, sendo este, obtido pela fórmula:

$$df = \frac{(\text{Var } H_1' + \text{Var } H_2')^2}{[(\text{Var } H_1')^2/N_1] + [(\text{Var } H_2')^2/N_2]}$$

#### 4.8.2 Riqueza de Margalef

Os índices de riqueza representam, essencialmente, a dimensão do número de espécies de uma unidade de amostra definida. Para o cálculo de riqueza utilizou-se o índice de Margalef, calculado pela equação:

$$R = (S - 1)/\ln N$$

onde, *N* representa o número total de indivíduos e *S* o número total de espécies.

#### 4.8.3 Equitabilidade de Sheldon

Os índices de equitabilidade determina quão igualmente abundantes são as espécies dentro de uma amostra. Para o cálculo da equitabilidade utilizou-se o índice de Sheldon através da fórmula:

$$E = e^{H'}/S$$

onde, *H'* representa a diversidade da amostra e *S* o número total de espécies.

#### 4.8.4 Cálculo de Similaridade entre as Comunidades

O cálculo de similaridade foi realizado através do índice de similaridade de Horn, pela fórmula:

$$Hor = \frac{[\sum (p_{ij} + p_{ik}) \cdot \log (p_{ij} + p_{ik})] - \sum p_{ij} \cdot (\log p_{ij}) - \sum p_{ik} (\log p_{ik})}{2 \cdot (\log 2)}$$

onde,  $pi_j$  e  $pi_k$  representam a proporção da espécie  $i$  na amostra  $j$  e  $k$  respectivamente. Para a análise da similaridade utilizou-se o agrupamento por UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical averages*) através da matriz de similaridade gerada pelo índice de Horn. Este índice foi escolhido por considerar a proporção dos indivíduos na amostra, diferente de outros índices como, por exemplo, o coeficiente de Jaccard que considera somente a relação entre presença e ausência de indivíduos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Foram inicialmente isolados 1822 fungos endofíticos aos 40 e 659 aos 60 dias após germinação das sementes em soja proveniente de cultivo orgânica, e 1783 fungos aos 40 e 505 aos 60 dias após germinação das sementes em soja proveniente de cultivo convencional (GRÁFICO 01), sendo estes agrupados em morfotipos baseando-se nas características macroscópicas. Os tratamentos foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (TABELA 01), demonstrando não haver diferença significativa relacionada ao número de fungos encontrados nas folhas de soja de cultivo orgânico e convencional (natureza), entretanto, pôde-se observar diferenças significativas relacionadas as épocas de coleta (época), demonstrando que o número total de fungos aos 40 e 60 dias são diferentes. A relação entre a época de coleta e a natureza da soja (orgânica e convencional) não foi significativa demonstrando não haver diferença entre os sistemas de produção orgânico e convencional quanto ao número de fungos isolados.

Pode-se observar claramente uma diminuição no número total de fungos isolados aos 60 dias, tanto para soja orgânica quanto para convencional. PETRINI (1991) atribui as variações na distribuição e diversidade de espécies de fungos endofíticos à fatores como: idade da folhagem e planta, localização, umidade local e estação do ano. Trabalhos realizados por RODRIGUES e SAMUELS (1994) em

*Euterpe oleracea*, e BERTONI e CABRAL (1988) em *Eucalyptus viminialis* indicaram um aumento na frequência de fungos isolados com o aumento da idade da folha. Outras plantas parecem seguir o mesmo padrão, sendo comum o aumento do número de fungos isolados com aumento da idade (BERSTEIN e CARROL, 1977; PETRINI e MÜLLER, 1979; PETRINI e CARROL, 1981). Entretanto PIMENTEL (2001), trabalhando com soja cultivada no campo e em casa de vegetação observou que a frequência de fungos endofíticos diminuía com o aumento da idade da planta em folhas de soja cultivada no campo.

GRÁFICO 01 – NÚMERO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL AOS 40 E 60 DIAS APÓS GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

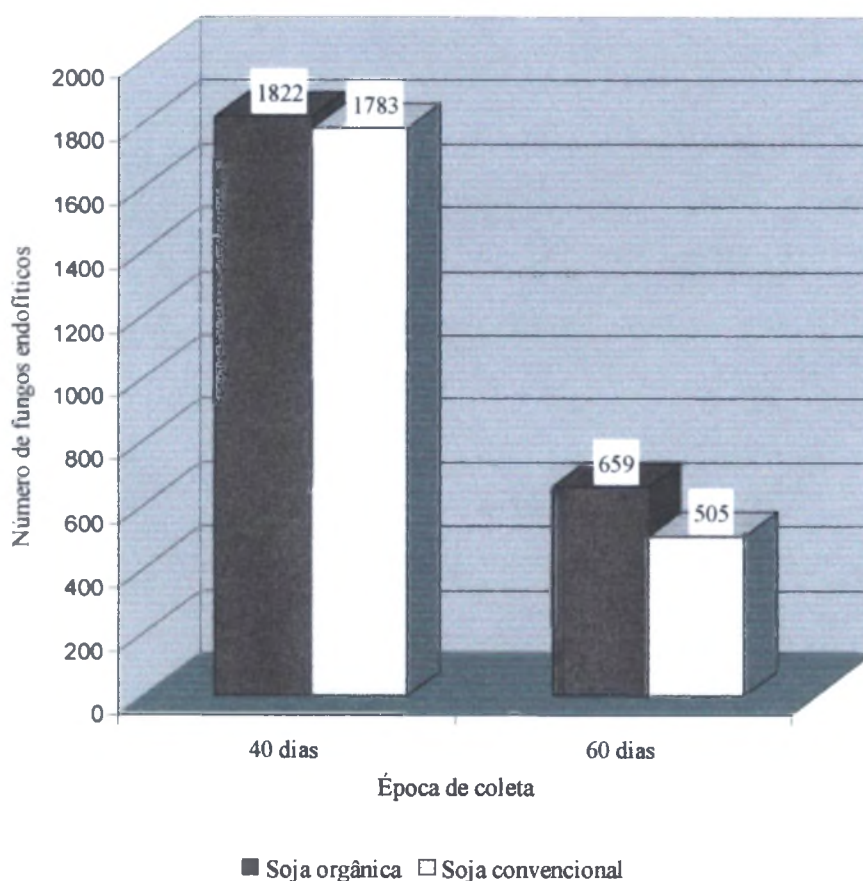


TABELA 01 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO TOTAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS EM RELAÇÃO AO TIPO DE CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL (NATUREZA) E ÉPOCA (40 E 60 DIAS APÓS GERMINAÇÃO DAS SEMENTES)

F.V	G.L	SQ	QM	F
Tratamento	3	299,39	99,80	295,97**
Natureza	1	0,44	0,44	1,31
Época	1	298,10	298,10	884,08**
Natureza X Época	1	0,84	0,84	2,50
Resíduo	796	268,40	0,34	
Total	799	567,79		

CV % = 24,02

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE ECOLÓGICA

Os fungos isolados foram identificados até gênero, sendo os morfotipos diferentes, considerados unidades taxonômicas distintas (TABELA 02).

TABELA 02 – FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL AOS 40 E 60 DIAS APÓS GERMINAÇÃO DAS SEMENTES.

FUNGOS ENDOFÍTICOS	continua			
	Soja orgânica		Soja convencional	
	40 dias	60 dias	40 dias	60 dias
<i>Acremonium</i> sp. I	37	-	13	25
<i>Acremonium</i> sp. II	26	2	-	-
<i>Acremonium</i> sp. III	-	4	2	-
<i>Acremonium</i> sp. IV	-	-	107	-
<i>Acremonium</i> sp. V	-	-	-	1
<i>Alternaria</i> sp. I	102	48	257	190
<i>Alternaria</i> sp. II	99	81	-	1

FUNGOS ENDOFÍTICOS	Soja orgânica		Soja convencional	
	40 dias	60 dias	40 dias	60 dias
<i>Alternaria</i> sp. III	-	-	1106	135
<i>Aspergillus niger</i>	6	5	5	2
<i>Aspergillus</i> sp. I	-	-	-	4
<i>Aureobasidium</i> sp. I	22	-	-	-
<i>Bipolaris</i> sp. I	133	29	31	12
<i>Bipolaris</i> sp. II	-	26	-	-
<i>Bipolaris</i> sp. III	-	16	-	-
<i>Bleptosporium</i> sp. I	-	6	-	-
<i>Chaetomium</i> sp. I	-	-	-	7
<i>Cladosporium</i> sp. I	41	13	-	-
<i>Colletotrichum</i> sp. I	31	-	-	-
<i>Colletotrichum</i> sp. II	6	-	-	-
<i>Colletotrichum</i> sp. III	7	-	-	14
<i>Colletotrichum</i> sp. IV	6	-	-	-
<i>Drechslera</i> sp. I	42	18	11	15
<i>Drechslera</i> sp. II	-	2	-	4
<i>Epicoccum</i> sp. I	10	-	-	-
<i>Epicoccum</i> sp. II	-	-	30	-
<i>Fusarium</i> sp. I	97	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp. II	22	19	-	-
<i>Fusarium</i> sp. III	7	-	-	1
<i>Fusarium</i> sp. IV	25	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp. V	11	-	-	1
<i>Fusarium</i> sp. VI	20	2	1	-
<i>Fusarium</i> sp. VII	-	4	-	-
<i>Fusarium</i> sp. VIII	-	10	-	-
<i>Fusarium</i> sp. IX	10	-	16	-

continuação

FUNGOS ENDOFÍTICOS	Soja orgânica		Soja convencional	
	40 dias	60 dias	40 dias	60 dias
<i>Geotrichum</i> sp. I	11	42	-	-
<i>Geotrichum</i> sp. II	-	-	10	-
<i>Harpographium</i> sp. I	-	10	-	-
<i>Idriella</i> sp. I	19	-	-	-
<i>Idriella</i> sp. II	-	-	2	-
<i>Mycelia sterilia</i> I	17	6	-	-
<i>Mycelia sterilia</i> II	17	-	6	-
<i>Mycelia sterilia</i> III	25	1	-	-
<i>Mycelia sterilia</i> IV	16	4	10	-
<i>Mycelia sterilia</i> V	25	-	8	-
<i>Mycelia sterilia</i> VI	-	30	-	1
<i>Mycelia sterilia</i> VII	-	51	-	10
<i>Mycelia sterilia</i> VIII	-	19	-	-
Não identificado I	9	-	-	-
Não identificado II	13	-	-	-
Não identificado III	29	-	-	-
Não identificado IV	11	-	-	-
Não identificado V	-	5	-	-
<i>Nigrospora</i> sp. I	127	-	52	57
<i>Nigrospora</i> sp. II	-	25	-	-
<i>Paecilomyces</i> sp. I	-	15	-	-
<i>Penicillium</i> sp. I	4	22	-	1
<i>Penicillium</i> sp. II	6	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp. III	67	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp. IV	-	3	-	-
<i>Pestalotiopsis</i> sp. I	80	-	112	-
<i>Phoma</i> sp. I	41	-	-	3

continuação

FUNGOS ENDOFÍTICOS	Soja orgânica		Soja convencional	
	40 dias	60 dias	40 dias	60 dias
<i>Pyricularia</i> sp. I	44	38	-	-
<i>Rhizoctonia</i> sp. (binucleada) I	100	15	-	-
<i>Rhizoctonia</i> sp. (binucleada) II	26	-	-	-
<i>Rhizoctonia</i> sp. (binucleada) III	111	32	-	-
<i>Rhizoctonia</i> sp. (multinucleada) I	100	5	-	10
<i>Rhizoctonia</i> sp. (multinucleada) II	-	23	-	-
<i>Sclerotium</i> sp. I	20	-	-	-
<i>Scopulariopsis</i> sp. I	-	9	-	-
<i>Scytalidium</i> sp. I	70	-	-	-
<i>Stemphylium</i> sp. I	-	6	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. I	-	7	-	10
<i>Trichophyton</i> sp. I	32	-	-	1
<i>Trichotecium</i> sp. I	30	6	-	-
<i>Trichotecium</i> sp. II	12	-	-	-
<i>Verticillium</i> sp. I	-	-	4	-
Nº total de indivíduos	1822	659	1783	505
Nº de espécies	48	38	19	22

NOTA: Os algarismos romanos após os nomes científicos indicam os diferentes morfotipos encontrados para cada gênero identificado.

Através do dendrograma construído utilizando-se o índice de similaridade de Horn pode-se notar a presença de dois grupos distintos de fungos, um caracterizando a soja orgânica e outro a convencional (GRÁFICO 02). Os fungos isolados das folhas de soja convencional aos 40 dias apresentaram 71% de similaridade com os isolados aos 60 dias, enquanto que para soja orgânica foi observado somente 47%. Os fungos endofíticos encontrados na soja orgânica e convencional se mostram bem distintos, apresentando apenas 27 % de similaridade entre eles. Este fato pode caracterizar a



presença de duas comunidades distintas, uma observada para a soja orgânica e outra para a soja convencional.

A análise de diversidade, riqueza e equitabilidade das comunidade de fungos endofíticos de soja orgânica e convencional aos 40 e 60 dias estão apresentados na TABELA 03.

GRÁFICO 02 – DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DO ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE HORN, COMPARANDO OS GRUPOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL AOS 40 E 60 DIAS

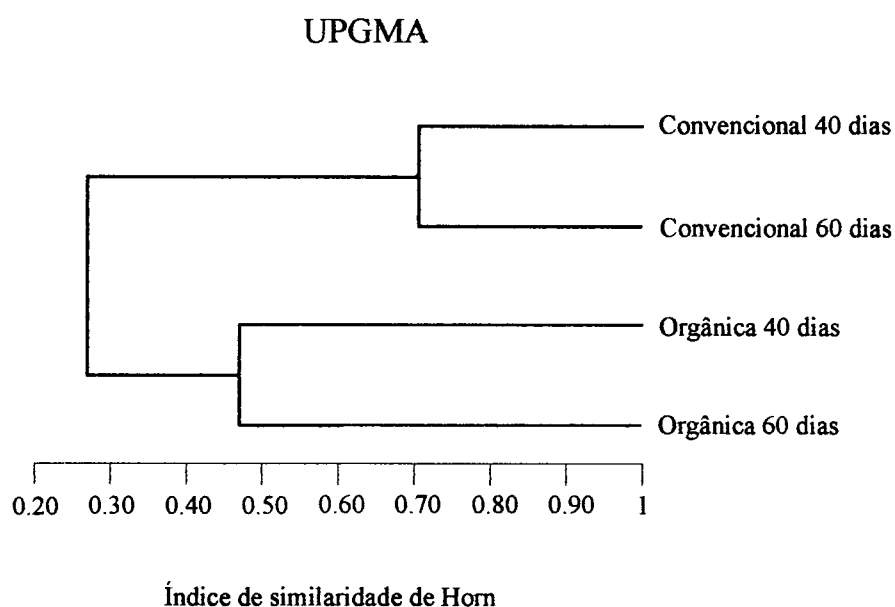


TABELA 03 – DIVERSIDADE, RIQUEZA E EQUITABILIDADE DAS COMUNIDADES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL AOS 40 E 60 DIAS

Comunidade de fungos endofíticos	Diversidade	Riqueza	Equitabilidade
soja orgânica aos 40 dias	3,428	6,260	0,677
soja orgânica aos 60 dias	3,233	5,700	0,667
soja convencional aos 40 dias	1,421	2,404	0,218
soja convencional aos 60 dias	1,916	3,374	0,309

De acordo com os dados apresentados na TABELA 03, os valores de diversidade das comunidades de fungos endofíticos da soja orgânica foram 3,482 para os 40 dias e 3,233 para os 60 dias, indicando uma pequena queda com o aumento da idade de planta. Estes valores foram significativos para o teste  $t$  à 1% de probabilidade ( $t = 6,922$ ;  $df = 1177$ ). A soja convencional, por sua vez, apresentou um aumento na diversidade de fungos endofíticos, indo de 1,421 para 1,916 com o aumento da idade da planta ( $t = 7,716$ ;  $df = 900$ ). Apesar do aumento da diversidade na soja convencional, os valores encontrados na soja orgânica mantiveram-se superiores, mesmo aos 60 dias. Estes valores coincidem com os valores usualmente encontrados em cálculos de diversidade. MARGALEF (1972) demonstrou que os valores da diversidade de Shannon são normalmente encontrados entre 1,5 e 3,5, raramente chegando a 4,5. MAY (1975) demonstrou que para se conseguir valores de diversidade maiores que 5 seria necessário uma amostra com  $10^5$  espécies.

Os valores de riqueza e equitabilidade apresentaram a mesma tendência demonstrada pela diversidade. Na soja orgânica, com o aumento da idade da planta, a riqueza de espécies e a equitabilidade tendem a diminuir, enquanto que para soja convencional observa-se o contrário. Entretanto, mesmo com esta diminuição na soja orgânica os valores de riqueza e equitabilidade permanecem maiores que os observados na soja convencional.

A análise isolada do sistema orgânico demonstra que com o aumento da idade da planta há uma diminuição na diversidade, no número de espécies (riqueza) e um aumento da dominância de algumas espécies sobre as outras, caracterizado pela diminuição da equitabilidade da amostra aos 60 dias. Valores altos de equitabilidade indicam que todas as espécies são igualmente abundantes, ou seja, tem a mesma participação no meio. Segundo DIX e WEBSTER (1995) a diversidade de espécies de fungos e o número de indivíduos tendem a ser altos durante os estágios iniciais de colonização de qualquer substrato, seguido de um período de relativa estabilidade e posterior declínio no número total de fungos e de espécies. Isto ocorre porque comunidades pioneiras são tipicamente compostas por um grande número de diferentes espécies, cada uma ocorrendo em uma baixa frequência sem dominância

específica entre elas, enquanto que comunidade maduras são normalmente compostas por poucas espécies com uma ou duas espécies dominantes.

A análise do sistema convencional demonstra uma diversidade baixa, com número de espécies baixo (riqueza) e dominância de algumas espécies sobre as outras, observado pela baixa equitabilidade, entretanto nota-se um ligeiro aumento da diversidade, riqueza e equitabilidade aos 60 dias. Estes dados são contrários aos dados relativos a sucessão de comunidades de fungos apresentados por DIX e WEBSTER (1995), indicando que de alguma forma o sistema soja convencional vem sofrendo algum tipo de distúrbio que tende a afetar a diversidade das espécies de fungos e o comportamento das mesmas ao longo do tempo. Distúrbios causados pelo aumento do estresse devido a diminuição dos níveis nutricionais, por interações antagonísticas entre espécies competidoras, ou pela presença de inibidores químicos no meio, inevitavelmente leva a uma alta taxa de extinção que não é compensada pela entrada de novas espécies, levando ao domínio de uma ou duas espécies que, de maneira geral, são altamente antagonísticas (KINKEL et al., 1987). Deste modo observa-se que a diversidade de fungos endofíticos apresentada pelo sistema orgânico é significativamente maior que a observada no sistema convencional, e que o comportamento apresentado pela comunidade de fungos endofíticos da soja convencional pode estar relacionado a um desequilíbrio produzido por algum distúrbio externo. Deve-se levar em conta que a soja orgânica, desde o plantio até a colheita e armazenagem das sementes, é livre de herbicidas, inseticidas e fungicidas, enquanto que o solo, as sementes e todo o processo de plantio de soja convencional utiliza regularmente tais produtos. Este pode ter sido o fator predominante na diferença entre a diversidade e comportamento das comunidades na soja orgânica e convencional, visto que ambas estavam plantadas na mesma propriedade e sujeitas aos mesmos fatores climáticos (considerando-se somente o macroclima). Esta diferença, entretanto, não refere-se exclusivamente a aplicação pontual de defensivos em períodos específicos do desenvolvimento da planta e sim à todo o processo de plantio convencional, uma vez que não foram aplicados agroquímicos na soja convencional até os 50 dias após a germinação das sementes (ANEXO) e mesmo assim observou-se

aos 20 dias uma diversidade inferior a apresentada pela soja orgânica no mesmo período. Os fatores que poderiam afetar a diversidade de fungos do sistema convencional poderiam estar relacionados a presença de resíduos químicos no solo ou o tratamento das sementes com fungicidas, o que diminuiria a população de fungos e a posterior colonização da planta.

A comparação dos sistemas orgânico e convencional pode ser observada na TABELA 04, onde foram desconsiderados a idade da planta, somando-se todas as espécies presentes aos 40 e 60 dias e aplicando-se os cálculos de diversidade, riqueza e equitabilidade.

TABELA 04 - DIVERSIDADE, RIQUEZA E EQUITABILIDADE DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL

Comunidade de fungos endofíticos	Diversidade	Riqueza	Equitabilidade
soja orgânica	3,717	8,444	0,614
soja convencional	1,674	4,266	0,157

O valor da diversidade dos fungos endofíticos isolados do sistema soja orgânica foi 3,717 enquanto que o valor para soja convencional foi de apenas 1,674. Estes valores foram significativamente diferentes para o teste  $t$  ao nível de probabilidade de 1% ( $t = 79,74$ ;  $df = 3695$ ). O sistema soja orgânica apresentou riqueza e equitabilidade maiores que o convencional, indicando que há um número maior de espécies e uma participação relativamente igual das mesmas no sistema orgânico, não ocorrendo (ou ocorrendo muito pouco) dominância de algumas espécies sobre as outras. Para a soja convencional pode-se observar, pela baixa equitabilidade, a dominância de algumas espécies, como por exemplo o gênero *Alternaria*, morfotipos I e III (TABELA 01).

Segundo GLIESSMAN (2000), em ecossistemas com baixa diversidade, as perturbações podem provocar, mais facilmente, modificações permanentes no funcionamento dos mesmos, resultando na perda de recursos do ecossistema e em

alterações na constituição de espécies, enquanto que, ecossistemas com alta diversidade tendem a ser capazes de se recuperar de perturbações e restaurar seu equilíbrio funcional mais rapidamente. De acordo com estes dados, PERFECT (1994) afirmou que a alta diversidade de um sistema cria uma capacidade amortecedora que faz com que as perturbações possuam pouco efeito na funcionalidade do mesmo.

Fungos endofíticos como *Aureobasidium* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp, isolados de folhas de soja orgânica e convencional, foram encontrados como endófitos no caule de espécies como *Ilex* sp., *Hedera* sp., *Fagus* sp. e *Juniperus* sp. (BODDY e GRIFFITH, 1989). Estes fungos podem ser considerados generalistas por não apresentarem um hospedeiro definitivo (DIX e WEBSTER, 1995).

Fungos endofíticos isolados neste trabalho como *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* sp. e *Colletotrichum dematium* foram encontrados por PEREIRA e colaboradores (1993), em folhas de *Stylosanthes guianensis*.

CANNON e SIMMONS (2002) analisando a diversidade de fungos endofíticos de folhas, em algumas espécies de árvores na reserva florestal de Iwokrama, observaram a presença de fungos como *Acremonium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium decemcellulare*, *Nigrospora sphaerica*, *Pestalotiopsis* sp., *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp., entre outros, constatando não haver uma relação específica entre os fungos isolados e os hospedeiros.

Muitos dos endófitos isolados da soja orgânica e/ou convencional foram também isolados por PIMENTEL (2001) em folhas de soja convencional da variedade COODETEC 202, como: *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Drechslera* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Paecilomyces* sp.

Dentre os fungos isolados da soja orgânica e convencional, alguns podem apresentar papel importante no controle de pragas agrícolas, como veremos a seguir.

### 5.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS ENTOMOPATOGÊNICOS DA SOJA ORGÂNICA E DA SOJA CONVENCIONAL.

O gênero endofítico entomopatogênico *Paecilomyces* sp. foi isolado da soja orgânica aos 60 dias. Este gênero causa o chamado muscardine amarelo em insetos e também possui algumas espécies que podem atacar nematóides de plantas (ALVES, 1998). Este não foi encontrado em soja convencional, entretanto PIMENTEL (2001) observou a presença deste endófito em folhas de soja convencional aos 20 e 40 dias. O gênero *Paecilomyces* sp. foi encontrado também como endofítico em folhas e caule de cevada e em espécies de *Alnus* (FISHER e PETRINI, 1990).

Outro fungo com potencial entomopatogênico encontrado somente na soja orgânica, aos 40 e 60 dias, foi o fungo *Cladosporium* sp. Segundo ROBBS e BITTENCOURT (1998) este fungo possui potencial entomopatogênico sendo encontrado como parasita fraco em moscas brancas e pulgões. Este fungo foi encontrado também em soja e milho por PIMENTEL (2001).

*Acremonium* sp. descrito por BREEN (1993 a; 1993 b) como endófito protegendo espécies de gramíneas contra o ataque de afídios e lepidópteros; assim como *Fusarium* sp. considerado por ALVES (1998) um agente entomopatogênico fraco que pode parasitar insetos em geral, inclusive produzindo toxinas semelhantes a beauvericina, foram encontrados em soja orgânica e convencional tanto aos 40 quanto aos 60 dias, coincidindo com os dados observados por PIMENTEL (2001).

O fungo *Verticillium* sp. foi encontrado somente na soja convencional aos 40 dias. Este fungo é um patógeno comum em pulgões e cochonilhas nas regiões tropicais e subtropicais, podendo também ocorrer sobre insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e sobre ácaros eriofiídeos (ALVES, 1998).

A proporção de gêneros possivelmente entomopatogênicos na soja orgânica e convencional pode ser observada na TABELA 03. Pode-se observar que 14,71% das espécies de fungos isolados de soja orgânica apresentam-se como possíveis entomopatogênicos, enquanto que praticamente a metade é observada para a soja convencional. Deve-se lembrar que estes gêneros foram levantados com base na

literatura especializada, sendo esta uma especulação perigosa, uma vez que para a real avaliação da capacidade entomopatogênica dos isolados seriam necessários testes *in vitro* e *in vivo* que pudessem estimar o grau de patogenicidade dos mesmos, e até de outros isolados.

TABELA 05 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS POSSIVELMENTE ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL

Possíveis endófitos entomopatogênicos	Soja orgânica (%)	Soja convencional (%)
<i>Acremonium</i> spp.	2,78	6,47
<i>Cladosporium</i> sp.	2,18	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	9,15	0,83
<i>Paecilomyces</i> sp.	0,60	0,00
<i>Verticillium</i> sp.	0,00	0,17
Total (%)	14,71	7,47

NOTA: Para esta estimativa foram agrupados os dados de 40 e 60 dias, e os morfotipos diferentes para os gêneros que apresentaram mais de um morfotipo. (ex: *Acremonium* spp. e *Fusarium* spp.)

## **6. CONCLUSÕES**

- Existem duas comunidades distintas de fungos endofíticos: uma característica do sistema orgânico e outra do convencional
- Diversidade de fungos endofíticos do sistema orgânico é maior que o do sistema convencional;
- Com o aumento da idade da planta, a comunidade de fungos endofíticos da soja orgânica apresenta uma diminuição da diversidade, da riqueza de espécies e da equitabilidade;
- Com o aumento da idade da planta, a comunidade de fungos endofíticos da soja convencional apresenta um aumento da diversidade, da riqueza de espécies e da equitabilidade;
- A soja proveniente de cultivo orgânico apresenta um número maior de fungos possivelmente entomopatogênicos que a proveniente de cultivo convencional.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2001.
- AINSWORTH, C. C.; SPARROW, F. K.; SUSSMAN, A. S. **The Fungi**. New York: Academic Press. v.4a, 1973.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.
- ARX, J. A. VON. **The Genera of fungi sporulation in pure culture**. 2 ed. Vaduz: J. Cramer, 1974.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 117-137.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J. O., ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n.1, p. 40-64, fev. 2000.
- ANDERSON, J. P. E.; ARMSTRONG, R. A.; SMITH, S. N. Methods to evaluate pesticide damage to the biomass of soil microflora. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 13, p. 149-153, 1981.
- BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. **Ecology**. Blackwell Science, 1996.
- BARNETT, H. C.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3 ed. Minneapolis: Burgess Publications, 1972.
- BERTONI, M. D.; CABRAL, D. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis* – Distribution of endophytes. **Nova Hedwigia**. v.46, p. 491-502, 1988.
- BERSTEIN M. E.; CARROL, G. C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**. V.55, p644-653, 1977.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; GALVÃO, J. A. H.; LIGO, M. A. V.; MINEIRO, J. L. C. Soil microorganisms in organic and conventional cropping systems. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 565-572, 2002.
- BING, L. A.; LEWIS, L. C. Occurrence of entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. virulence towards

*Ostrinia nubilalis* (Hübner). **Agriculture Ecosystems and Environment**, v.45, p.147-156, 1993.

BODY, L.; GRIFFITH, G. S. Role of endophytes and latent invasions in the development of decay communities in sapwood of angiospermus trees. **Sydowia**. v.41, p.41-73, 1989.

BREEN, J. P. Enhanced resistance to fall armyworm (Lepdoptera: Noctuidae) in *Acremonium* endophyte-infected turfgrasses. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 621-629, 1993a.

BREEN, J. P. Enhanced resistance to three species of aphids (Homoptera: Aphididae) in *Acremonium* endophyte-infected turfgrasses. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 1279-1286, 1993b.

BURN, A. J. Long-term effects of pesticides on natural enemies of cereal crop pests. In: BURN, A. J. **Pesticides and Non-target Invertebrates**. United Kingdom: P.C. Jepson Press, p.177 – 193, 1989.

CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**. v.94, p.210-220, 2002.

CARROL, G. C. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1313-1324, 1995.

CHABOUSSOU, F. **Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos: a teoria da trofobiose**. Porto Alegre: L & PM, 1987.

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. Itaguaí: UFRJ-Imprensa Universitária, 1981.

DAVIS, B.N.K.; WILLIAMS, C. T. Bufferzone widths for honeybees from ground and aerial spraying of insecticides. **Environmental Pollution**, v. 63, p. 247-259, 1990.

DIX, N. J.; WEBSTER, J. **Fungal ecology**. London: Chapman & Hall, 1995.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Surrey, Common health Mycological Institut, 1971.

ELLIS, M. B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Surrey, Common health Mycological Institut, 1976.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja: Região Central do Basil**. Disponível em: <<http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br>> Acesso em 20 Dez. 2003.

FAEP. **Federação da Agricultura do Estado do Paraná – informações soja**. Disponível em: <[www.faep.com.br/meiorural/prinfo/2002/08.asp](http://www.faep.com.br/meiorural/prinfo/2002/08.asp)> Acesso em 02 Set. 2003.

FISHER, P. J.; PETRINI, O. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England and Switzerland. **Mycological Research**. v.04, p. 313-319, 1990.

FUNK, C. R.; HALINSK, P. M.; JOHNSON, M. C.; SIEGEL, M. R.; STEWART, A. V.; AHMAD, S.; HURLEY, R. H.; HARVEY, I. C. An endophytic fungus and resistance to sod webworms: association in *Lolium perene*. **Biotechnology**, v. 1, p. 189-191, 1983.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2000.

GRUE, C. E.; TOME, M. W.; DEWEESE, L. R.; MINEAU, P.; SWANSON, G. A.; FOSTER J. R.; ARNOLD, P. M. Potential impacts of agricultural chemicals on waterfowl and other wildlife inhabiting prairie wetlands: an evaluation of research needs and approaches. **Transactions North American Wildlife National Research Conference**, v. 51, p. 357-383, 1986.

HALLMANM, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

HELLAWEL, J. M. **Biological indicators of freshwater pollution and environmental management**. New York: Elsevier Applied Science Publishers LTD, 1986.

IBGE. **Censo agropecuário 1995/1996**. Rio de Janeiro, 1998.

KINKEL, L. L.; ANDREWS, J. H.; BERBEE, F. M.; NORDHEIM, E. V. Leaves as islands for microbes. **Oecologia**. v.71. p. 405-408, 1987.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia Médica**. 2ª ed. São Paulo: Editora Premier, 1999.

KONEMAN, E. W.; ROBERTS, G. D. **Micologia Prática de Laboratório**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1987.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. New York, Elsevier, 1987.

LEIJ, F. A. A. M.; WHIPPS, J. M.; LYNCH J. M. Traditional methods of detecting and selecting functionally important microorganisms from soil and the rhizosphere. In: ALLSOPP, D.; COLWELL, R. R.; HAWKSWORTH D. L. **Microbial diversity and ecosystem function**. CAB INTERNATIONAL, 1995. p. 321-336.

LIU, C. I.; ZOU, W. X.; LU, I.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 277-282, 2001.

MARGALEF, R. Homage to Evelyn Hutchinson or why is there an upper limit to diversity. **Arts and Science**.v.44, p.211-235, 1972.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton University Press, 1988.

MAY, R. M. Patterns of species abundance and diversity. In: CODY, M. L. & DIAMOND J. M. **Ecology and Evolution of Communities**. Belknap Press of Harvard University p. 81-120, 1975.

O'DONNELL, A. G.; GOODFELLOW M.; HAWKSWORTH D. L. Theoretical and practical aspects of the quantification of biodiversity among microorganisms. In: HAWKSWORTH D. L. **Biodiversity: measurement and estimation**. England: The Royal Society and CHAPMAN & HALL, 1995. p. 65-73.

OLEMBO, R. Importance of microorganisms and invertebrates as components of biodiversity. In: HAWKSWORTH, D. L. **The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture**. London: CAB INTERNATIONAL, 1994. P 145-148.

PERFECT, T. J. Biodiversity and tropical pest management. In: HAWKSWORTH, D. L. **The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture**. London: CAB INTERNATIONAL, 1994. P 145-148. Pilzliche Endophyten am Beispiel von *Juniperus communis* L. **Sydowia**. v.32, p.223-251, 1979.

PEREIRA, J. O.; VIEIRA, M. L. C.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata*: a preliminary study. **Mycologia**. v.85, p.362-364, 1993.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J. V. D. **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge University Press, 1986.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic of tree leaves. In: ANDREWA, J.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves**. Spring Verlag, 1991.

PETRINI O.; CARROL G. Endophytic fungi in foliage of some Cupressacea in Oregon. **Canadian Journal of Botany**. v.59, p.629-636, 1981

PIMENTEL, I. C. **Fungos endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas**. Curitiba, 2001. 154p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. Controle Biológico de Insetos – O controle biológico de insetos nocivos à agricultura com o emprego de Fungos Imperfeitos ou Hifomicetos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Ano II, p. 10-12, 1998.

RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. *Letendraeopsis palmarum*, a new genus and species of cleistothecial Loculoascomycetes. **Mycologia**. v.82, p.254-258, 1994.

ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; SPIELMAN, L. J. **A literature guide for the identification of plant pathogenic fungi**. APS Press, 1987.

SCHNURER, J.; ROSSWALL, T. Mineralisation of nitrogen from  $^{15}\text{N}$  labeled fungi, soil microbial biomass and roots, and its uptake plants. **Plant and Soil**, v. 102, p.71-78, 1987.

SCIALABBA N. E.; HATTAM, C. **Organic agriculture, environment and food security**. Rome: Food and agriculture organization of the united nations press, 2002.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of Soybean Diseases**. Third Edition. Minnesota: The American Phytopathological Society Press, 1993.

SIVAPALAN, A.; WENDY, M. C.; FRANZ, P. R. Monitoring populations of soil microorganisms during a conversion from a conventional to an organic system of vegetables growing. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 10 p. 9-27, 1993.

STROBEL, G. A.; DIRKSIE, F.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-534, 2003.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

WAAGE, J. K. Biodiversity as a resource for biological control. In: HAWKSWORTH, D. L. **The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture**. London: CAB INTERNATIONAL, 1994. P 145-148.

WAGNER, B.; LEWIS, L. Colonization of corn, *Zea mays*, by the enthomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3468-3473, 2000.

WALKER, H. B. Biodiversity and ecological redundancy. **Conservation Biology**, v.6, n. 1, 1992.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Relative importance of the effects of 2,4-D glyphosate and environmental variables on the soil microbial biomass. **Plant and Soil**, v. 134, p.209-219, 1991.

WEBBER, J. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**, v. 292, p.449-451, 1981.

## **ANEXO**

# ANEXO - PRODUTOS APLICADOS NA SOJA ORGÂNICA E CONVENCIONAL

